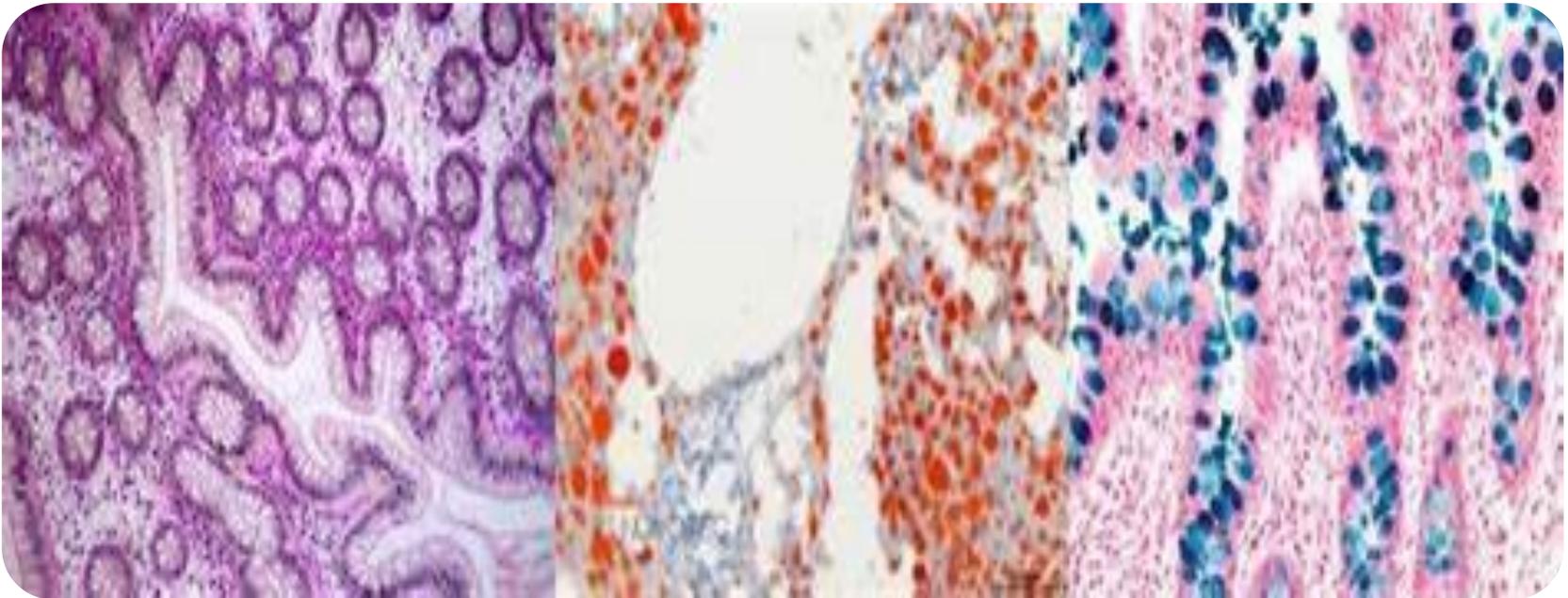


Module: Techniques de laboratoire II :

Cours n°03:

Techniques d'identification

Immunohistochimie et immunocytochimie



Plan du cours



I. Définition

II. Evolution des la technique

III. Les étapes suivies

IV. Domaines d'application

**V. Exemple de protocole de marquage post
inclusion**

Immunohistochimie

Objectif

Repérer un Ag sur un tissu (ou cellules) : l'Ag peut être une protéine, une hormone...etc.

Immunocytochimie

I. Définition



L'immunohistochimie, ou IHC, désigne la méthode de **localisation des protéines** situées dans les cellules d'un tissu, organites cellulaires, bactéries, virus, etc. . Cette méthode utilise les **anticorps** pour détecter les **antigènes**.

Le réactif principal est un **anticorps** dirigé contre l'antigène à marquer ; **des traceurs** (molécules fluorescentes, enzymes etc.) fixés directement ou indirectement sur cet anticorps permettent de voir la réaction.

L'immunohistochimie est généralement employée pour détecter et assurer le suivi des **cancers** grâce à la détection de **tumeurs cancéreuses** . Ainsi, de nombreux marqueurs spécifiques ont été découverts pour repérer différents cancers, comme l'antigène carcino-embryonnaire pour le **cancer du côlon** ou le CD 117 pour les tumeurs stromales gastro-intestinales.

II. Evolution des la technique

Année	Microscopie	traceurs utilisés
1939-1941	À fluorescence	Fluorescéine
1959	Électronique	Ferritine
1966	Optique	Enzymes
1971	Électronique	Enzymes
1971	Électronique MET	or colloïdal
1975	Électronique MEB	or colloïdal



III. Les étapes suivies

Comment???

- ❖ Repérer l'Ag à marquer
- ❖ Obtenir un Ac spécifique dirigé contre l'Ag en question (par immunisation par exemple) ainsi que des Ac II marqués par un traceur (enzyme, fluorochrome, ...) dirigés contre cet Ac I.
- ❖ Préparer le tissu;
- ❖ Procéder au marquage : exposer le tissu aux Ac I (si c'est cet **Ac I** qui est associé à un **traceur**, on parle de **méthodes directes**), repérer les complexes Ag-Ac par **l'Ac II marqué** (dans ce cas on parle de **méthodes indirectes**);
- ❖ Révéler (selon le traceur : pour l'enzyme par exemple, on ajoute son substrat spécifique...) et observer (selon la technique microscopique désirée).

III. Les étapes suivies

III.1. Préparation du tissu

(Fixation, déshydratation, inclusion, coupe.)

□ La fixation

Le but: de la fixation est de garder la structure des cellules mortes. Elle immobilise les molécules in situ, particulièrement les Ag et préserve la structure du tissu.

Inconvénients :

- La fixation peut modifier les Ag et changer leur affinité aux Ac;
- Elle peut provoquer une réticulation(liaison des chaines moléculaires entre elles) du tissu, ce qui peut freiner ou empêcher la diffusion des réactifs (Ac I, AcII, substrats...) à l'intérieur du tissu.

D'où l'importance du choix du fixateur :

- Selon la finesse des détails à conserver (microscopie optique ou électronique);
- Selon la structure du tissu à préserver;
- Selon le type de molécules à immobiliser (protéines, lipides,...)

III. Les étapes suivies



Il existe plusieurs types de fixateurs :

- Des fixateurs déshydratants (chaleur, alcools et cétones, lyophilisation ...)
- Des fixateurs précipitants (acides picrique, acétique)
- Des composés métalliques (mercure, zinc, osmium)
- Des agents de pontage chimique (agent de couplage) est un composé qui aide à la dissolution et à la dispersion des solvants organiques dans les formulations à base d'eau (aldéhydes : formaldéhyde, glutaraldéhyde; acroléine; acide tannique).

III. Les étapes suivies



Les fixateurs développés spécialement pour l'IHC :

- Périodate-lysine-**formaldéhyde** (fixation simultanée de sucres et de protéines);
- Benzoquinone (protéines);
- Carbodiimide (protéines);
- Diéthylpyrocarbonate (DEPC)
- Le zinc
- La chaleur.

III. Les étapes suivies

Choix du fixateur :

- Un bon fixateur doit conserver d'une manière appropriée le tissu et écarter tout risque d'altération après réhydratation et toute perte d'Ag par solubilisation.
- Une telle fixation peut se faire avec le **para-formaldéhyde** qui **stabilise** les **protéines** des tissus par des **liaisons covalentes**.
- La fixation ne doit pas être trop forte pour ne pas empêcher la pénétration ultérieure des conjugués et l'accessibilité des épitopes aux Ac.
- La fixation par le **formol** permet de **conserver la morphologie** des cellules **mais détruit certains Ag**.
- La fixation par **l'acétone** permet de mieux **conserver les Ag** labiles et de **révéler les Ag intra-cytoplasmiques** **mais conserve moins bien la morphologie cellulaire**. Quant au **méthanol**, il permet **d'accéder aux Ag cytoplasmiques** en lésant la membrane cytoplasmique.

Certains Ag ne supportent pas la fixation (elle les dénature ou les masque). Dans ce cas, ces tissus peuvent être congelés dans de l'azote liquide, puis coupés dans un cryostat. Les coupes seront traitées après séchage

III. Les étapes suivies

□ La déshydratation

Retirer l'eau des cellules au cours de passages successifs dans des bains d'alcool (éthanol, méthanol, acétone) de plus en plus concentrés.

- La durée de chaque passage dépend de la taille du tissu (de 5 - 10 nm pour des cellules isolées ou en monocouche à plusieurs jours pour des organes entiers de volume $> 10 \text{ cm}^3$).
- La déshydratation peut se faire par **lyophilisation** (freeze-drying) : évaporer sous vide la glace présente dans les tissus.

Elle peut se faire également par **cryo-substitution** (freeze-substitution): les tissus congelés sont laissés plusieurs jours dans des bains d'un solvant (éthanol, acétone...) qui va extraire la glace des tissus.

III. Les étapes suivies

□ L'inclusion

On infiltre généralement les tissus par un milieu d'inclusion liquide qui pourra être durci par :

- refroidissement (paraffine),
- polymérisation (résines)
- ou dessiccation (gélatine).

Une fois inclus le tissu peut être débité en coupes dont l'épaisseur peut varier, suivant le milieu d'inclusion et les couteaux utilisés, d'une dizaine de microns à une centaine de nanomètres.

La plupart des milieux d'inclusion sont hydrophobes : une déshydratation préalable est donc indispensable pour leur permettre de pénétrer dans les tissus.

III. Les étapes suivies



Le choix du milieu d'inclusion s'effectue en fonction :

- Du type de microscope à utiliser : optique ou électronique
- La facilité à dissoudre le milieu (pour un marquage post-inclusion)
- La crainte de perturber la reconnaissance Ag-Ac.

III. Les étapes suivies



Les principaux milieux d'inclusion :

- a) **Les paraffines** : utilisables pour la microscopie optique. Pour des marquages post-inclusion. Elles sont facilement dissoutes par le toluène ou l'éther de pétrole.
- b) **Les résines époxy** : polymérisées à chaud (60°C). Les plus utilisées : l'Araldite, l'Épon et le Spurr.
- c) **Les résines acryliques** : hydrophiles (ne nécessite pas de déshydratation préalable à l'alcool). Permettent d'obtenir des réactions immunohistochimiques plus intenses.

III. Les étapes suivies

□ La coupe

Il est souvent nécessaire d'amincir les échantillons (fines coupes) pour pouvoir les observer.

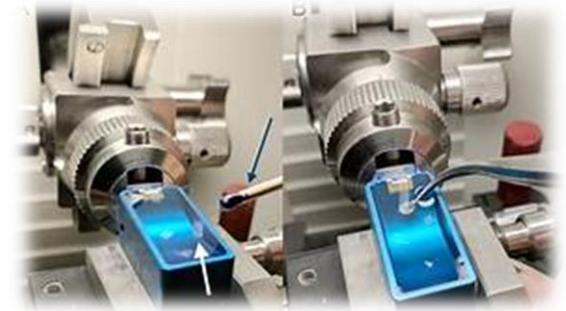
La coupe s'effectue avec :

- **Des vibratomes** : dans le cas de tissus mous, réalisent des coupes de 40-100 μm d'épaisseur.
- **Des microtomes** : réalisent des coupes de moins de 20 μm d'épaisseur pour la microscopie optique
- **Des ultra-microtomes** : réalisent des coupes de 100 nm et moins d'épaisseur pour la microscopie électronique.



III. Les étapes suivies

- **Des cryostats** : des microtomes placés dans une enceinte réfrigérée à -20°C qui réalisent des coupes de 5-10 mm d'épaisseurs pour la microscopie optique.
- **Des ultra-microtomes à congélation** aux environs de -90°C qui réalisent des coupes pour la microscopie électronique.



III. Les étapes suivies



III.2. Marquage

Le marquage peut se faire avant, pendant ou après la préparation des coupes :

Marquage pré-inclusion

Le marquage est réalisé avant tout autre traitement. Idéale pour le marquage des préparations:

(de virus; de tissus frais; de cellules vivantes en suspension ou en culture)

III. Les étapes suivies



Les liaisons Ag-Ac ne sont pas perturbées par les fixations et les inclusions.

Par contre, les Ac diffusent difficilement dans l'épaisseur des tissus et entre les différents compartiments cellulaires;

Les réactifs peuvent se concentrer dans certains compartiments;

Les Ag peuvent être détruits par des enzymes présentes dans les tissus ou dans les antisérums.

III. Les étapes suivies



□ Marquage Pré-inclusion post-fixation

Le marquage est effectué après fixation du tissu. Un traitement dans le but de rendre le tissu plus perméable aux Ac peut être fait avant le marquage. Une deuxième fixation (sur-fixation) peut également se faire après l'application de l'Ac I.

Cette méthode peut préserver parfaitement la structure du tissu pour la microscopie optique (un peu moins pour la microscopie électronique).

Elle a l'inconvénient d'être complexe et longue.

III. Les étapes suivies



□ Marquage Post inclusion

Les inconvénients de cette méthode :

- les fixation- inclusion peuvent perturber la reconnaissance Ag-Ac;
- la difficulté de dissoudre certains milieux d'inclusion
- la perméabilité du tissu aux Ac peut être mauvaise.

III. Les étapes suivies



❖ Observation au microscope optique

- Trier les coupes
- Post-fixation au tétroxyde d'osmium
- Déshydratation et inclusion dans une résine
- Confection de coupes ultrafines

❖ Observation au microscope électronique

Le marquage est effectué sur des coupes après fixation et inclusion du tissu.

- C'est une technique rapide et simple.
- Avec des bons fixateurs, la préservation structurale et ultra-structurale peut être optimale.
- Les Ag intracellulaires sont accessibles à la surface des coupes.

Prélèvement

Préparation du tissu

Coupes

Prétraitements

(la plupart facultatifs)

Marquage

Observations



Classique

-  Fixation
-  (Postfixation)
-  Déshydratation
-  Inclusion

Congélation

-  Fixation
 -  Rinçage
 -  Cryoprotection
- 

Cryosubstitution

-  Congélation
-  Cryosubstitution fixation
-  Inclusion

Microscopie optique

Microscopie électronique

- 
- dissolution du milieu d'inclusion
 - "etching"
 - traitement enzymatique etc.

Anticorps primaire

Anticorps secondaire marqué

V. Exemple de protocole de marquage post inclusion



□ Etapes de Marquage

Les coupes ou les cellules sont:

- ✓ incubées avec l'Ac I de 40 à 60 minutes dans une chambre humide.
- ✓ Elles sont rincées
- ✓ Puis incubées avec **l'Ac II conjugué** pendant 1h à 1h30.
- ✓ Ensuite, après rinçage, elles sont incubées dans la solution du substrat durant un temps déterminé (en fonction de l'enzyme et du substrat utilisé).
- ✓ Enfin, après rinçage à l'eau distillée, elles sont montées entre lames et lamelles.
- ✓ Observation microscopique.

IV. Domaines d'application



Domaine clinique :

- ❖ **Diagnostics de cancers**, détection de cellules anormales (exemples : recherche l'antigène carcino-embryonnaire pour la détection du cancer de côlon...) ; recherche d'ADN/ARN viraux pour le diagnostic de maladies (hépatites B et C, ...) ; diagnostics de troubles neurodégénératifs ...

Domaine de recherche fondamentale :

- ❖ **Localisation de biomarqueurs** et de **protéines** exprimés dans différentes parties de tissus biologiques ; exemple en génétique : pour la localisation de gènes entrant dans des processus biologiques fondamentaux telle **l'apoptose** (mort cellulaire programmée)

Domaine de la reproduction :

- ❖ **Détection d'hormones de reproduction** et de leurs récepteurs (GnRH, FSH, l'hormone alphanérotrope dans le placenta,...)

Merci pour votre attention